Der Zusammenhang von Insulinbindung und Insulinwirkung bei Fettzellen adrenalektomierter Ratten.

Antje Bug

1981

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545801_0048

Aus dem Institut für Diabetesforschung
Krankenhaus München Schwabing

Vorstand: Prof. Dr. med. H. Mehnert

Der Zusammenhang von Insulinbindung und Insulinwirkung bei Fettzellen adrenalektomierter Ratten.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von :

Antje Bug

München

April 1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD W.KEMMLER

Mitberichterstatter: PROF. H.MEHNERT

Dekan: PROF. W.SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 11.6.1981

1. Einleitung:

Der Einfluß des Insulins auf die Fettzelle als einem seiner Erfolgsorgane ist weitgehend bekannt. So fördert Insulin u.a. den Glucosetransport durch die Zellmembran, erhöht die Glucoseoxidationsraten und die Lipogenese aus Glucose und hemmt die Lipolyse (50). Der Mechanismus der Wirkung dieses Hormons ist jedoch bis jetzt im Einzelnen noch nicht geklärt.
1949 formulierten Levine et al. die Hypothese, daß der erste Schritt der Insulinwirkung an der Membran der Zellen zu suchen sei, da Insulin den Zuckertransport durch die Zellmembran steigert (33). Weiteren Aufschluß gab Pastan 1966 mit der Entdekkung, daß die Insulinwirkung durch Waschen des Gewebes mit einer Lösung, die Insulin-Antikörper enthielt, aufgehoben werden konnte (49). Daraus war zu schließen, daß das Insulinmolekül reversibel an der Zelloberfläche gebunden wird. Kono zeigte 1969, daß normale Fettzellen nach Trypsinbehandlung die Fähigkeit verlieren auf Insulin zu reagieren ohne in ihren sonstigen Funktionen gestört zu sein. Dies ließ vermuten, daß Trypsin ein Protein an der Zelloberfläche zerstört, das vielleicht den Rezeptor darstellt (28).
Einen wesentlichen Fortschritt hat die Entwicklung von mit ^{125} Jod hochmarkierten Hormonpräparationen gebracht, deren biologische Eigenschaften durch die Markierung nicht wesentlich verändert werden. Damit wurde ermöglicht detaillierte Studien der Hormonbindung vorzunehmen. Insulin und andere Proteohormone haben die Eigenschaft an verschiedenen Oberflächen zu binden, wie z.B. Glas und Talg. Die Bindung allein kann daher keinen Beweis für die spezifische Rezeptorbindung an irgendeinem System darstellen. Um die Bindung des Insulins an einem biologischen System als Rezeptorkoppelung zu charakterisieren, wurden daher verschiedene Kriterien aufgestellt. Die Bindung muß ausgezeichnet sein durch:

1. Hohe Affinität für Insulin
2. Hohe Spezifität für Insulin; d.h. das Insulinmolekül kann durch andere Proteohormone nicht vom Rezeptor verdrängt werden.

3. Koppelung von Affinität und biologischer Aktivität. Dies Kriterium besagt, daß die Affinität abgewandelter oder natürlicher Insuline zum Rezeptor der biologischen Aktivität der Insuline entspricht.
4. Reversibilität und rasche Aufsättigung der Bindung
5. Abhängigkeit vom pH-Wert
6. Abhängigkeit von der Temperatur

Der spezifische Insulinrezeptor wurde nach diesen Kriterien an verschiedenen Erfolgsorganen des Insulins wie Leber, Fettzellen, Muskulatur nachgewiesen. Allerdings wurde er auch an Organen gefunden, an denen keine Insulinwirkung gezeigt werden konnte, wie Monozyten, Gehirnzellen und Lymphozyten (26).
Es ist jedoch noch nicht gelungen den Rezeptor direkt zu charakterisieren, da eine Reinigung des Rezeptors auf methodische Schwierigkeiten gestoßen ist. Noch immer ist die indirekte Charakterisierung über die Verdrängungsstudien von heißem Insulin durch nichtmarkiertes Insulin der wesentliche Zugang zur Erfassung des Rezeptors.

Die Studie des Insulinrezeptors hat in der letzten Zeit auch klinische Bedeutung erlangt. So stellt die Rezeptorbindung des Insulins bei der Untersuchung der Insulinresistenz einen neuen Ansatzpunkt dar. 1972 zeigte Kahn am Modell von Mäusen mit genetisch bedingter Fettsucht und Hyperglykämie (ob/ob Maus) und einer hohen Resistenz gegenüber endogenem und exogenem Insulin eine Insulinbindung der Lebermembranen, die nur 16-35 % der Bindung von Zellen normaler Tiere erreichte. Kahn führte die verminderte Bindung des Insulins an den Lebermembranen der ob/ob Mäuse auf eine erniedrigte Rezeptorenzahl zurück, die eine Ursache für die Insulinresistenz dieser Tiere darstellen könnte. Damals konnte jedoch nicht geklärt werden, ob die erniedrigte Rezeptorenzahl den primären vererbten Defekt darstellt oder ob sie eine Folge der Fettsucht, des chronischen Hyperinsulinismus oder anderer Faktoren ist (24).
In weiteren Versuchen an Tieren, die eine Hyperinsulinämie aufwiesen, kam man zu ähnlichen Ergebnissen (32,51,55).

1976 beschrieb Olefsky auch bei insulinresistenten übergewichtigen Patienten eine erniedrigte Insulinbindung an Fettzellen und Monozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe von Gesunden (46).

Um die direkte Wirkung des Insulinspiegels auf die Rezeptorbindung näher zu beleuchten, wurden in vitro Versuche durchgeführt und nach Inkubation mit Insulin an Lymphozyten (17), Fettzellen (36) und Hepatozyten (8) eine erniedrigte Insulinbindung festgestellt. Zusammenfassend ließen diese Versuche vermuten, daß das Insulin seinen eigenen Rezeptor im Sinne einer "Nieder-Regulation" beeinflußt.

Im Gegensatz dazu ist die Regulation der Rezeptoren im Insulinmangel bisher noch nicht entsprechend genau untersucht worden. 1975 beschrieben Hepp et al. an einem Tiermodell des Insulinmangels, dem genetisch-diabetischen Chinesischen Hamster, eine Erhöhung der Insulinbindung am Rezeptor (21). Bei mit Streptozotozin vorbehandelten Ratten (59) oder bei hungernden Tieren (47) fand man ebenfalls eine erhöhte Bindung des Insulins.
Die Frage, welchen Einfluß diese Hochregulation im Insulinmangel auf die Insulinsensitivität hat, ist bisher nur an wenigen Modellen mit widersprüchlichen Ergebnissen untersucht worden.

In dieser Arbeit soll ein weiteres Modell des Insulinmangels, die adrenalektomierte Ratte untersucht werden. Die Adrenalektomie als Tiermodell, das mit dem Morbus Addison als klinischem Krankheitsbild vergleichbar ist, zeichnet sich u.a. durch folgende Symptomatik aus : Niedrige Blutglucosewerte, Überempfindlichkeit gegenüber endogenem und exogenem Insulin, Gefahr der Exsikkose durch Elektrolyt- und Wasserverlust.

Die Fragestellungen der vorliegenden Arbeit sind :

1. Wie verhalten sich die Insulinrezeptoren nach Adrenalektomie? Findet sich hier ein Zusammenhang mit den Insulinspiegeln?
2. Ist eine Beziehung zu erkennen zwischen der Insulinüberempfindlichkeit nach Verlust der Nebennieren in vivo und dem Insulineffekt in vitro?

3. Wie verhalten sich Insulinbindung und Insulinsensitivität nach Adrenalektomie gemessen an verschiedenen Effekten des Hormons auf den Fettzellmetabolismus?

2. Materialien und Methoden

2.1. Materialien :

2.1.1. Geräte :

- Eppendorf Zentrifuge 3200
- Eppendorf Photometer 1101 M mit Küvettenwechselautomat 2705 und Kompensationsschreiber
  Eppendorf Gerätebau Netheler & Hinz GmbH
  D-2000 Hamburg, Deutschland

- Szintillationszähler Modell 3385
  Packard GmbH
  D-6000 Frankfurt/Main, Deutschland

- Automatic Gamma Counting System MR 252
  Kontron Elektronik GmbH
  D-8057 Eching, Deutschland

- Pyro-Mag-Stir
- Whirl-Mix
  Cenco Instrumenten Mu.N.V.
  Breda, Niederlande

- Beckman Mikrofuge 152
  Fa. Beckman
  D-8000 München, Deutschland

- pH-Meter
  Fa. Pusl
  D-8000 München, Deutschland

- Zeiss Mikroskop mit Ocular Mikrometer
  Carl Zeiss
  D-7082 Oberkochen, Deutschland

- Hettich Rotixa Zentrifuge
  Fa. Andreas Hettich
  D-7200 Tuttlingen, Deutschland

- Analysenwaage Typ H 15
  Fa. Spoerhase AG
  D-6300 Gießen, Deutschland

2.1.2 Substanzen

2.1.2.1. Isotopenmarkierte Verbindungen :

- 3-O-Methyl-D (^{14}C) - Glucose
  (spez. Aktivität 50mCi/mmol)
- D- (1-^{14}C) Glucose
  (spez. Aktivität 50mCi/mmol)
  Radiochemical Center, Amersham
  Buchler GmbH,
  D-3300 Braunschweig, Deutschland

- ^{125} J-Insulin (spez. Aktivität
  24-28 mCi/mg)
  Novo Company
  Kopenhagen, Dänemark

2.1.2.2. Organische Verbindungen :

- Monokomponentinsulin vom Rind
  (27U/mg)
  Novo Company
  Kopenhagen, Dänemark

- Depotinsulin Hoechst CR
  Hydrocortison (5mg/ml)
  Farbwerke Hoechst AG
  D-6000 Frankfurt/Main, Deutschland

- Rinderalbumin
  Behring Company
  D-3550 Marburg/Lahn, Deutschland

- Collagenase Worth 4197 (181U/mg)
  Worthington Biochemical Cooperation
  Freehold, New Jersey, 07724 / USA

2.1.2.3. Organische und anorganische Chemikalien

- Fa. Merck
  D-6100 Darmstadt, Deutschland

- Szintigel
  Roth Company
  D-7500 Karlsruhe, Deutschland

2.1.3. Plastikartikel :

- Fa. Eppendorf
  D-2000 Hamburg, Deutschland

- Fa. Beckman
  D-8000 München, Deutschland

- Packard GmbH
  D-6000 Frankfurt/Main, Deutschland

2.1.4. Tiere

- Wistar Ratten männlich
  Fa. Egon Jautz
  D-7964 Kisslegg, Deutschland

2.2. Methoden

2.2.1. Adrenalektomie - Operationstechnik

Es wurden weiße männliche Wistar-Ratten verwendet (Gewicht 150-170 g). Die Ratte wurde mit Äther in Narkose versetzt und das Operationsfeld am Rücken abrasiert. Nach Desinfektion mit Merfentinktur wurde unterhalb des Rippenbogens beidseits der Wirbelsäule ein circa 1,5 cm langer Hautschnitt gelegt, das Bauchfell mit der Spitze einer Schere durchstoßen und stumpf durch Entfalten der Schere getrennt. Nach behutsamer Darstellung der Nebennieren am oberen Nierenpol wurden diese in toto entfernt. Dann wurde das Bauchfell und die Haut gut adaptiert und mit zwei Knopfnähten aus Catgut verschlossen.
Bei den scheinoperierten Tieren wurden die Nebennieren nur dargestellt und, ohne diese entfernt zu haben, die Wunde verschlossen.

2.2.2. Tierhaltung und Substitutionsschema

Es wurden fünf Gruppen von Ratten gebildet :

Gruppe A : Die Tiere wurden adrenalektomiert, erhielten Futter ad libitum und Kochsalzlösung.

Gruppe S : Nach der Scheinoperation erhielten sie Futter ad libitum und Wasser.

Gruppe SH : Nach der Scheinoperation erhielten sie dieselbe Menge an Futter, die von den Tieren der Gruppe A pro Tag gefressen wurde und Wasser.

Als Scheinsubstitution wurde diesen drei Gruppen 2 mal täglich Kochsalzlösung gespritzt.

Gruppe AI : Adrenalektomierte Tiere erhielten 2 mal täglich 1,5 U Depot Insulin Hoechst CR gespritzt, Futter ad libitum und 5 % Glucose in Kochsalzlösung.

Gruppe AC : Nach Adrenalektomie bekamen diese Ratten 2 mal täglich 2,5 mg Hydrocortison gespritzt, Futter ad libitum und Kochsalzlösung.

Die Substitutionsbehandlung wurde gleich nach der Operation begonnen und am fünften postoperativen Tag vor der Fettzellpräparation beendet.

2.2.3. Pufferlösungen für den Fettzelltest

Als Ausgangslösung wird der Krebs-Ringer-Hepes-Puffer (57) verwendet mit den Konzentrationen NaCL 121, 4mM; KCL 4,8 mM; $CaCL_2$ 2,5 mM; KH_2PO_4 1,2 mM; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1,2 mM und Hepes 25,0 mM. Der Hepes-Puffer I zur Fettzellpräparation besteht zu gleichen Teilen aus Krebs-Ringer-Hepes-Puffer und dialysiertem Rinderalbumin 10 g%. Die Konzentration im gebrauchsfertigen Puffer I an Albumin beträgt nun 5 g%. Der pH-Wert wird bei 37°C durch Zugabe von 1M NaOH auf 7,8 eingestellt.

Der Hepes-Puffer II besteht aus zwei Teilen Krebs-Ringer-Hepes-Puffer, einem Teil Rinderalbumin 10 g% und einem Teil Aqua destillata. Die Albuminkonzentration dieses Puffers beträgt 2,5 g% und der pH-Wert wird bei 37°C auf 7,4 eingestellt; die Na^+-Konzentration ist nun 131 mM. Dieser Puffer wurde in allen Fettzelluntersuchungen verwendet.

2.2.4. Fettzellpräparation (nach Rodbell, 52)

Die Ratten werden durch Nackenschlag getötet und der Nebenhodenfettkörper sofort freipräpariert. Auf 4 mg Collagenase und 2 ml Puffer I (37°C, pH 7,8) in einem Plastikgefäß (Packard Scintillation Vial 20 ml) werden 1,5 g des kleingeschnittenen Nebenhodenfettkörpers eingewogen. Anschließend werden die Proben mit Carbogen (95 %O_2, 5 %CO_2) begast, verschlossen, mit Parafilm umwickelt und im Wasserbad bei 37°C mit einer Schüttelfrequenz von 120/min 60 min lang inkubiert. Nach Ende der Inkubation werden die freigesetzten Zellen durch einen vorher mit Aqua destillata gewaschenen Nylonstrumpf vom übrigen Gewebe abfiltriert und viermal mit Puffer II (37°C, pH 7,4) zur Entfernung der Collagenase gewaschen. Hierzu werden die Zellen bei 400 rpm 2 min zentrifugiert, das Medium mit einer Einmalspritze abgesaugt und dann die Zellen mit 8 ml Puffer II aufgewirbelt. Dieser Vorgang wird dreimal wiederholt.

2.2.5. Insulinbindungstest

Prinzip :
Die Methode des Insulinbindungstest beruht auf der Verdrängung von radioaktiv markiertem Insulin am Rezeptor durch unmarkiertes Insulin. Die Kinetik der Verdrängungskurve gibt nach Auswertung durch die Methode von Scatchard Auskunft über die Bindungsaffinität und Bindungskapazität der Rezeptoren. Die Menge des radioaktiv markierten Insulins, die in Anwesenheit von hohen Mengen unmarkierten Insulins (1E/ml) nicht mehr verdrängbar ist, wird als unspezifische Bindung definiert und von der Gesamtbindung abgezogen (25).

Verfahren :
1 ml gepackte Fettzellen werden mit 9 ml Puffer II verdünnt. Davon werden Proben von 400 µl (4-6x10^5 Zellen/ml) entnommen, die mit 50 µl einer ^{125}J-Insulinlösung (100 µU/ml) und 50 µl einer Lösung mit unmarkiertem Rinderinsulin (10 µE-1E/ml) oder 50 µl Puffer II als Basalwert bei 25°C im Wasserbad 45 min inkubiert werden. Anschließend werden aus dem Testgemisch jeweils 400 µl in Gefäße mit 100 µl Dinonylphthalat überpipettiert und bei 10000g 2 min lang zentrifugiert. Dadurch erfolgt eine Trennung des an die Fettzellen gebundenen Insulins vom ungebundenen Insulin im Medium, da die Fettzellen durch die Ölschicht, die das Medium überdeckt, nach oben wandern (27). Durch einen Schnitt durch die Ölschicht wird die Fettzellschicht abgetrennt. Im Gamma-Zähler wird die Aktivität des ^{125}J-Insulins gezählt. Als Standardwert (insgesamt verfügbare Menge an radioaktiv markiertem Insulin) wird der Mediumanteil von drei Proben ebenfalls gezählt und der Mittelwert berechnet.

2.2.6. Bestimmung des 3-O-Methylglucose-Transports

Prinzip :
3-O-Methylglucose verhält sich bezüglich des Transports in die Zelle wie D-Glucose, kann aber nicht weiter verstoffwechselt werden und häuft sich dort an. Die Menge der aufgenommenen 3-O-Methylglucose in der Zelle ist folglich ein direktes Maß für den Glucosetransport durch die Zellmembran. Dies gilt jedoch nur für einen kurzen Zeitraum.

Dann kommt es zu einem ständigen gleichzeitigen Efflux und Influx der 3-O-Methylglucose durch die Membran.

Verfahren :
Es werden Fettzellen ($5x10^6$/ml) bei 37°C inkubiert. Davon werden Proben von 100 µl zusammen mit jeweils 200 µl einer 3-O-Methylglucoselösung (Endkonzentration 500 µmol/l, 0,1 µCi 1- (^{14}C) -3-O-Methylglucose als Tracer) in einer Mischpipette (Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, France) aufgezogen und gemischt. Nach 5,15,25,40,60 und 120 sec werden Zellen und Medium durch Zentrifugation von 1 min durch Dinonylphthalat getrennt. Die Zellschicht wird mit 200 µl Diphenyläthylamin in ein Packardgefäß gespült und 30 min stehengelassen. Dann wird mit 10 ml Szintigel aufgefüllt und die Aktivität der mit ^{14}C -markierten 3-O-Methylglucose im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen.
Zur Berechnung der Menge an 3-O-Methylglucose, die an der Außenseite der Zellmembran haftet, werden bei jedem Versuch Anfangskinetiken bei 5,15 und 25 sec erstellt. Diese Werte werden gegen Null extrapoliert und der extrapolierte Wert als Leerwert bei den folgenden Messungen abgezogen. Für die Untersuchung des Insulineffekts werden die Fettzellen mit Insulin (1,5-10000 µU/ml) 15 min lang vorinkubiert.

2.2.7. Antilipolyse

Prinzip :
Katecholamine stimulieren die Hydrolyse der Triglyzeride zu Glyzerin und Fettsäuren, die von Insulin gehemmt wird. Die Menge an frei-

gesetztem Glycerin in Anwesenheit von Katecholaminen ist um so geringer je größer die Insulinwirkung an den Fettzellen ist.

Verfahren :
Gepackte Fettzellen werden mit Puffer II 1:40 verdünnt und in einem Plastikgefäß gerührt. Proben von 800 µl ($1x10^5$ Zellen/ml) werden zusammen mit 100 µl einer Isoproterenollösung (10^{-6}M) und 100 µl Rinderinsulinlösung (10 µU-10000 µU/ml) bzw. 100 µl Puffer II als Basalwert bei 37°C 1 Stunde inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion werden die Proben anschliessend in Eis gestellt. Nach 10 min werden die Zellen vom Medium durch Filtration durch Papierfilter getrennt. Die Bestimmung der Menge an Glycerin im Medium erfolgt enzymatisch (siehe bei Substratbestimmungen).

2.2.8. Lipogenese (nach Moody et al, 40)

Prinzip :
Insulin steigert die Lipogenese aus Glucose sowohl über den Einbau in Fettsäuren als auch über das Diphosphoglycerat. Dieser Einbau markierter C-Atome aus der Glucose in die Gesamtlipide kann durch Extraktion der Lipide bestimmt werden.

Verfahren :
Proben von 800 µl verdünnten Zellen ($4x10^4$ /ml) werden mit 100 µl Rinderinsulinlösung (1-10000 µU /ml) und 100 µl Glucoselösung (Endkonzentration 1 mM, 0,1 µCi 2- (^{3}H)-Glucose als Tracer) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 10 ml Toluolszintillator dazu pipettiert und

geschüttelt. Der fettlösliche Anteil des Gemisches löst sich darin und die Aktivität der 2- (^{3}H)-Glucose kann in dieser Schicht im Flüssigkeits-Szintillationszähler gemessen werden. Es wird zusätzlich ein Eiswert bestimmt : Die Zusammensetzung der Probe ist wie beim Basalwert; es wird anstatt 1 Stunde bei 37°C bei 0°C inkubiert. Dieser unspezifische Adsorptionswert wird von allen Meßwerten abgezogen.

2.2.9. Glucoseoxidation (nach Weltzel et al., 58)

Prinzip :
Insulin steigert den Glucoseabbau sowohl über den Pentosephosphatweg als auch den Embden-Meyerhofweg. Die CO_2 -Produktion aus ^{14}C-markierter Glucose durch Stimulation mit Insulin kann als Maß für diesen Insulinwirkungsmechanismus verwendet werden.

Verfahren :
800 µl verdünnte Fettzellen ($4x10^4$/ml) werden mit 100 µl einer Rinderinsulinlösung (1-10000 µU/ml) und 100 µl Glucoselösung (Endkonzentration 1 mM, 0,1 µCi 1-(^{14}C) -Glucose als Tracer) eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend werden zum Stoppen der Reaktion 200 µl 10 % H_2SO_4 zugegeben und 400 µl Diphenyläthylamin in das Zentrifugengläschen, das am Deckel des Reaktionsgefäßes befestigt ist, pipettiert. Nach weiterer Inkubation von 30 min bei 37°C lagert sich das freigesetzte $^{14}CO_2$ in dem Gläschen ab und wird bei Inkubationsende in 10 ml Szintigel aufgenommen. Im Flüssigkeits-Szintillationszähler wird die Aktivität des

$^{14}CO_2$ gemessen. Es wird auch hier ein Eiswert bestimmt.

2.2.10. Cortisonvorinkubation in vitro

Prinzip :
Mit Cortison oder Puffer im Inkubationsmedium vorbehandelte Fettzellen normaler Ratten werden einem Insulinbindungstest (s.o.) unterzogen.

Verfahren :
Es werden zwei getrennte Fettzellpräparationen mit je 1,5 g Fett des Nebenhodenfettkörpers- wie eingangs beschrieben- erstellt. Zusätzlich bekommen die Zellen C (mit Cortison vorzuinkubierende Zellen) bei der Inkubation 1 ml einer Hydrocortisonlösung (Endkonzentration $8x10^{-8}$M/l) (47) und die Zellen N (normale Zellen) 1 ml Puffer II zugesetzt.

Nach der Fettzellpräparation werden jeweils 1 ml gepackte Zellen der Gruppen (C) und (N) mit 4 ml Puffer II und 1 ml einer Cortisonlösung (Endkonzentration $8x10^{-8}$M/l) bei (C) und 1 ml Puffer II bei (N) mit 100 mg % Glucose bei 37°C und sehr langsamer Schüttelfrequenz für 3 Stunden inkubiert. Nach der Hälfte der Zeit wird das Medium abgesaugt und verworfen und frisches Medium in gleicher Zusammensetzung zugegeben. Nach Ablauf der 3 Stunden werden die Zellen 2 mal mit Puffer II gewaschen und gepackt zum Insulinbindungstest verwendet.

2.2.11. Glycerinbestimmung (nach Eggstein und Kuhlmann, 12)

Prinzip :

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{GK} \text{Glycerin-3-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{PK} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} + H^+ \xrightarrow{LDH} \text{Lactat} + \text{NAD}^+$$

GK = Glycerokinase; PK = Pyruvatkinase; LDH = Lactatdehydrogenase; PEP = Phosphoenolpyruvat;

Verfahren :

0,5 ml Reagentiengemisch (71,4 mM TRAM (Triäthanolamin-Hydrochlorid); 8,5 mM Mg^{2+}; 1,0 mM PEP; 0,4 mM NADH; 2,0 mM ATP, 20 µg PK/ml $\geq$ 3U/ml; 10 µg LDH/ml = 3,6 U/ml) werden mit 0,3 ml TRAM-Puffer und 0,2 ml Probe gemischt und in Küvetten pipettiert. Über 10 min wird die Extinktionsänderung gemessen. (ΔE_1)

Zum Starten der Reaktion werden 0,005 ml Glycerinkinaselösung (5 µg GK/ml = 0,42 U/ml) zum Bestimmungsansatz pipettiert, gemischt und die Extinktionsänderung bis zur Konstanz der Reaktion registriert. (ΔE_2). Zur Bestimmung des Leerwertes werden 0,2 ml Aqua bidest. anstelle der Probe verwendet. ΔE_{Ges} errechnet sich aus der Differenz $\Delta E_2 - \Delta E_1$.

Die Konzentration an Glycerin wird nach folgender Formel berechnet :

$$C = \frac{\Delta E \times V}{\varepsilon \times v \times d} \; \mu\text{Mol/ml}$$

c = Konzentration; E = Extinktion; ε = Extinktionskoeffizient (cm^2 / µMol); V = Testvolumen; v = Probevolumen; d = Schichtdicke (1 cm).

2.2.12. Insulin-Radioimmunassay zur Bestimmung der Seruminsulinspiegel (34)

Die Grundlage dieser Methode ist die Verdrängung von markiertem Hormon von seinem spezifischen Antikörper durch unmarkiertes Hormon. Bei steigender Konzentration von unmarkiertem Hormon vermindert sich die Menge des Antikörpers, die zur Bindung mit markiertem Hormon zur Verfügung steht um die Menge der Komplexe des unmarkierten Hormons mit dem Antikörper. Die gesuchte Serumkonzentration eines Hormons wird ermittelt durch den Vergleich der noch vorhandenen Menge an markiertem und gebundenen Hormon mit einer Eichkurve. Diese wird mit Standardlösungen, deren Menge an unmarkiertem Hormon bekannt ist, erstellt.

2.2.13. Proteinbestimmung (nach Lowry, 35)

Das Protein wird mit Trichloressigsäure gefällt, 10 min stehengelassen und abzentrifugiert. 0,01 - 0,2 ml des Niederschlags werden mit 5 ml Reaktionslösung (50 Teile 0,1 N NaOH mit 2 % Na_2CO_3 und 1 Teil 100 ml Aqua destillata mit 1 g Na-Citrat und 0,5 $CuSO_4$ x $5H_2O$) geschüttelt und 20 min stehengelassen. Anschliessend werden 0,5 ml Folin-Reagenz (Verdünnung 1:2) zugesetzt und 60 min bei 30°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgt bei 578 nm. Die Menge des Proteins in mg/ml wird durch den Vergleich mit dem Standardwert berechnet.

2.2.14. Bestimmung der Gesamtlipide (60)

Prinzip :
Die Probe wird ohne vorherige Enteiweißung mit konzentrierter Schwefelsäure erhitzt und anschließend mit Phosphorsäure-Vanillin-Reagenz umgesetzt. Bei dieser sog. Sulfophospho-vanillin-Reaktion bilden die Lipide einen rosa Farbstoff, welcher nach Zöllner et al. photometrisch bestimmt wird. Die Gesamtfett-Konzentration der Probe ergibt sich durch Vergleich mit einer Standardlösung.

Verfahren :
0,05 ml Probe bzw. 0,05 ml Lipidstandardlösung (entsprechend 1000 mg Lipid / 100 ml) werden mit 2 ml Schwefelsäure (95-97 %) vermischt, 10 min in kochendem Wasser erhitzt und anschließend 5 min in Eis abgekühlt. Von den Reaktionsgemischen werden jeweils 0,10 ml in 2 ml Farbreagenz (11,9 mol/l Phosphorsäure, 8 mmol/l Vanillin) gegeben und nach 40 - 50 min die Extinktion der Analysen und des Standards bei 510 - 560 nm gegen die Blindprobe (0,10 ml Schwefelsäure und 2 ml Farbreagenz) gemessen.

2.2.15. Bestimmung der Serumglucose (6)

Prinzip :

$$\text{Beta-D-Glucose} + H_2O + O_2 \xrightarrow{GOD} \text{D-Gluconsäure} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Dianisidin-}H_2 \xrightarrow{POD} 2H_2O + \text{Dianisidin}$$

GOD = Glucose-Oxidase; POD = Peroxidase;

Die Menge des aus Dianisidin-H_2 gebildeten Farbstoffs Dianisidin ist ein Maß für die umgesetzte Glucose. Die gemessene Extinktion wird auf diejenige eines Glucose-Standardwertes bezogen.

Verfahren :
Die Blutproben werden mit Uranylacetat-NaCL-Lösung (0,16 % in 0,9 % NaCL-Lösung) enteiweißt. 5 ml Glucose-Reagenz (0,12 M Puffer, 50 µg Chromogen/ml, 1,5 U POD/ml, 9 U GOD/ml) werden mit 0,20 ml enteiweißter Probe bzw. Glucose-Standardlösung (3,5 µg Glucose/ml) gemischt und 30 - 40 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Proben und der Standard werden bei 420 - 470 nm gegen den Leerwert mit Wasser gemessen.

Chromogen = 5 mg o-Dianisidin-hydrochlorid/ml.

Der Fettzelldurchmesser wurde unter einem Zeiss Mikroskop mit einem Ocular Mikrometer gemessen.
Die statistischen Daten wurden nach dem Student's t-Test ermittelt.

3. Ergebnisse

3.1. Basisuntersuchungen der einzelnen Tiergruppen

Die Auswirkungen der Adrenalektomie, Cortisonsubstitution und Insulinbehandlung auf Körpergewicht, Glucose- und Insulinspiegel der Ratten sind in Tabelle I dargestellt. Der Vergleich der Gewichte der Gruppen, zeigte eine geringere Gewichtszunahme der adrenalektomierten Tiere (A) im Verhältnis zu den scheinoperierten (S), was auf die geringere Futteraufnahme nach der Operation zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß Adrenalektomie zu einer verminderten Futteraufnahme führt, wurde schon von Leathem et al. (31) beschrieben. Um den Effekt dieser Inappetenz besser einschätzen zu können, wurde eine Kontrollgruppe von scheinoperierten Tieren (SH) eingeführt, die nur eine beschränkte Menge an Futter bekamen, nämlich so viel wie die adrenalektomierten Tiere (A) gefressen hatten. Ihr Körpergewicht unterschied sich nicht von dem der adrenalektomierten Tiere (A).
Die Möglichkeit der Exsikkose durch Elektrolyt- und Wasserverlust bei den adrenalektomierten Tieren (A) wurde durch die Verwendung von isotonischer Kochsalzlösung als Trinkwasser beseitigt. Beim Vergleich der Glucosespiegel in den verschiedenen Gruppen konnte kein wesentlicher Unterschied festgestellt werden. Bezüglich des Insulinspiegels zeigten die Fettzellen der adrenalektomierten Tiere (A) einen Abfall um fast 50 % gegenüber den Zellen der scheinoperierten Tiere (S). Diejenigen Tiere, die adrenalektomiert und mit Cortison substituiert (AC) worden waren, hatten einen doppelt so hohen Insulinspiegel wie die Kontrollgruppe (S). Es konnten keine Unterschiede im Fettzelldurchmesser und im Lipidgehalt der Fettzellen zwischen den verschiedenen Gruppen festgestellt werden (siehe Tabelle I).

TABELLE I

Charakteristika der Tiergruppen und Fettzellen :

	Adrenalektomierte Ratten (A)	Scheinoperierte Ratten (S)	Adrenalektomierte Ratten mit Insulin-Behandlung (AI)	Adrenalektomierte Ratten mit Cortison-Behandlung (AC)
Serum Insulin (ng/ml)	0,7 ± 0,1	1,6 ± 0,2	9,1 ± 1,3	3,0 ± 0,2
Serum glucose (mmol/l)	6,9 ± 0,1	7,6 ± 0,15	6,3 ± 0,1	8,1 ± 0,1
Körpergewicht (g)	194 ± 3	206 ± 2	206 ± 2	188 ± 5
Fettzelldurchmesser (µm)	74 ± 2	77 ± 3	79 ± 3	72 ± 2
Gesamtlipide (mg/10^5 Zellen)	11,4 ± 1,1	11,9 ± 1,3	11,6 ± 0,7	11,7 ± 1,3

Die Glucose- und Insulinwerte wurden bei den Tieren nach Futteraufnahme bestimmt und stellen den Mittelwert aus 8 Bestimmungen ± SEM in jeder Gruppe dar. Bei der Gruppe der scheinoperierten Tiere handelt es sich nicht um die kontrolliert gefütterten Tiere (SH). Die Körpergewichte wurden bei 32 Tieren pro Gruppe, der Fettzelldurchmesser bei 300 Zellen von 8 Tieren pro Gruppe und die Gesamtlipide von 8 Tieren pro Gruppe bestimmt. Die Unterschiede bei den Insulin- und Glucosespiegeln waren zwischen allen Gruppen statistisch signifikant ($p \leq 0,001$). Die Körpergewichte der Gruppen A und AC waren statistisch signifikant($p \leq 0,001$) unterschiedlich zu denjenigen der Gruppen S und AC. Alle anderen Unterschiede waren nicht statistisch signifikant.

3.2. Insulinbindung

Die Insulinbindung an den isolierten Fettzellen war über einen weiten Konzentrationsbereich bei den adrenalektomierten Tieren (A) signifikant erhöht (siehe Abb. 1). *
Zu klären war nun, ob die erhöhte Bindung des Insulins nicht als Folge der geringeren Gewichtszunahme, d.h. der relativen Inappetenz der adrenalektomierten Tiere (A), im Verhältnis zu den scheinoperierten (S) angesehen werden mußte. Folgender Kontrollversuch wurde durchgeführt :
Es wurde ein Insulinbindungstest bei Insulinkonzentration von 0 µE, 100 µE, 500 µE und 1 E/ml in Doppelwerten mit den isolierten Fettzellen der Gruppe der scheinoperierten Tiere erstellt, die nur die Futtermenge verabreicht bekamen, die von den adrenalektomierten gefressen worden war (SH). Aus den Ergebnissen von 5 Versuchen wurden Mittelwerte bestimmt. Es ergaben sich fast identische Bindungswerte bei der Gruppe der scheinoperierten Tiere (S) und der scheinoperierten, im Futter beschränkten Tiere (SH) (siehe Abb. 1).

Die Bindungswerte der verschiedenen Gruppen (S, A, AC, AI) sind in Form des Scatchard plot in Abb. 2 zusammengefaßt. Die Bindungskurve der adrenalektomierten Tiere (A) läuft parallel zu der Kurve der scheinoperierten Tiere (S) nach oben verschoben, d.h. die Steigung beider Kurven ist identisch. Aus dem Schnittpunkt der Kurven mit der Abszisse ergibt sich die Kapazität der Rezeptoren. Dies zeigt, daß nach Adrenalektomie nicht eine Änderung der Affinität auftritt, die zu einer erhöhten Bindung führt, sondern eine Erhöhung der Kapazität.

* Abbildungen siehe Seite 26 - 31.

Bei der Bindungskurve der mit Cortison substituierten Tiere (AC) zeigte sich, daß dieses Hormon die Erhöhung der Rezeptorenzahl nach Adrenalektomie verhinderte.
Nach der Behandlung der adrenalektomierten Tiere mit Insulin (AI) ergab sich bei niedrigen Insulinkonzentrationen eine Erhöhung der Bindung wie bei den Fettzellen der nur adrenalektomierten Tiere (A). Bei hohen Insulinkonzentrationen folgte die Bindungskurve derjenigen der scheinoperierten Tiere (S).
Das bedeutet : Die Insulinbehandlung von adrenalektomierten Tieren verhinderte eine Erhöhung der Bindungskapazität.

Aus diesen Resultaten ergab sich folgende Fragestellung :
Wie verändert eine sehr geringe Menge Cortison als Substitution die Bindung an den Fettzellen bei gleichbleibendem Insulinspiegel ? Welche Bindungskurve ergibt sich bei einer weiteren Gruppe ACI (adrenalektomiert, Cortison- und Insulinsubstituiert) im Verhältnis zu den Kurven der adrenalektomierten Tiere, die entweder mit Cortison (AC) oder mit Insulin (AI) allein substituiert worden waren ?

Die Gruppe (ACI) wurde folgendermaßen vorbehandelt : Nach Adrenalektomie bekamen die Tiere 2 mal täglich 1,5 U Depot Insulin Hoechst CR und 2 mal täglich 0,5 mg Hydrocortison gespritzt, Futter ad libitum und 5 % Glucose in Kochsalzlösung.

Mit dieser Versuchsanordnung, wahrscheinlich bedingt durch die geringen Substitutionsdosen, waren keine eindeutigen Ergebnisse zu erzielen; (die Einzeldaten werden nicht gezeigt).

3.3. Insulineffekt

Die Veränderung des Insulineffekts auf den GLUCOSETRANSPORT nach Adrenalektomie zeigt Abb.3. Insulin in submaximaler Konzentration erhöht den Transport von 3-O-Methylglucose in der Gruppe der adrenalektomierten Tiere (A) signifikant stärker als in der Gruppe der scheinoperierten Tiere (S).. Die Basalwerte der Glucoseaufnahme betrugen bei den adrenalektomierten Tieren (A) 63,2 $\pm$ 4,1 pmol /10^5 Zellen x 40 sec, während sie bei der Kontrollgruppe (S) nur 35,4 $\pm$ 3 pmol/10^5 Zellen x 40 sec waren. Auf dem Signifikanzniveau p = 0,01 sind die Basalraten des Glucosetransports damit bei den adrenalektomierten Tieren (A) höher als bei den scheinoperierten Tieren (S). Im Bereich maximaler Insulinkonzentration von 10 mU/ml betrugen die Werte 155,6 $\pm$ 14 pmol/10^5 Zellen x 40 sec bei den Fettzellen der adrenalektomierten Tiere (A) und 127,8 $\pm$ 10,1 pmol/10^5 Zellen x 40 sec bei denjenigen der scheinoperierten Tiere (S). Dies Ergebnis zeigt, daß die maximale Stimulierbarkeit durch Insulin bei den Fettzellen beider Gruppen gleich groß ist.

Bei einem anderen Insulineffekt auf die Fettzelle, der LIPOGENESE, die mit Hilfe des Einbaus von 2-^{3}H-Glucose in Fettsäuren gemessen wurde, zeigte sich bei den Zellen der adrenalektomierten Tiere (A) eine erhöhte Sensitivität gegenüber submaximalen Insulinkonzentrationen wie Abb. 4 verdeutlicht. Die basalen und maximal stimulierten Lipogeneseraten waren in beiden Gruppen gleich.

Ebenfalls eine erhöhte Sensitivität bei submaximalen Insulinkonzentrationen wiesen die Fettzellen der adrenalektomierten Tiere (A) bei der Versuchsreihe ANTILIPOLYSE im Verhältnis zu der Kontrollgruppe (S) auf. Das Ergebnis der Versuche zeigt Abb. 5.

Wie schon bekannt, erwiesen sich die Zellen von Ratten im Zustand nach Adrenalektomie (A) als weniger empfindlich gegenüber der Wirkung von Katecholaminen (14). Bei der Messung der basalen Raten der Glycerolfreisetzung ergaben sich die Werte 19,54 $\pm$ 3,9 nmol/10^5 Zellen x h bei der Kontrollgruppe (S) und 19,9 $\pm$ 3,9 nmol/10^5 Zellen x h bei der Gruppe der adrenalektomierten Tiere (A). Die Glycerolfreisetzung erreichte nach Stimulation mit Isoproterenol (10^{-6}M) bei den scheinoperierten Tieren (S) die Werte 334,1 $\pm$ 34 nmol/10^5 Zellen x h und bei den adrenalektomierten Tieren (A) 268,87 $\pm$ 30,5 nmol/10^5 Zellen x h.

Bei der Untersuchung der Wirkung des Insulins auf die GLUCOSE-OXIDATION bei den beiden Gruppen, die mit ^{14}C-markierter Glucose gemessen wurde, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Zellen der scheinoperierten Tiere (S) und der adrenalektomierten Tiere (A) wie Abb. 6 verdeutlicht.
Die Basalwerte waren gleich bei (S) mit 2,5 $\pm$ 0,3 nmol/10^5 Zellen x h und 2,2 $\pm$ 0,3 nmol/10^5 Zellen x h bei (A). Ebenfalls gleich waren die Werte nach maximaler Stimulation mit Insulin mit 12,2 $\pm$ 1,4 nmol/10^5 Zellen x h bei (S) und 10,8 $\pm$ 1,6 nmol/10^5 Zellen x h bei (A).

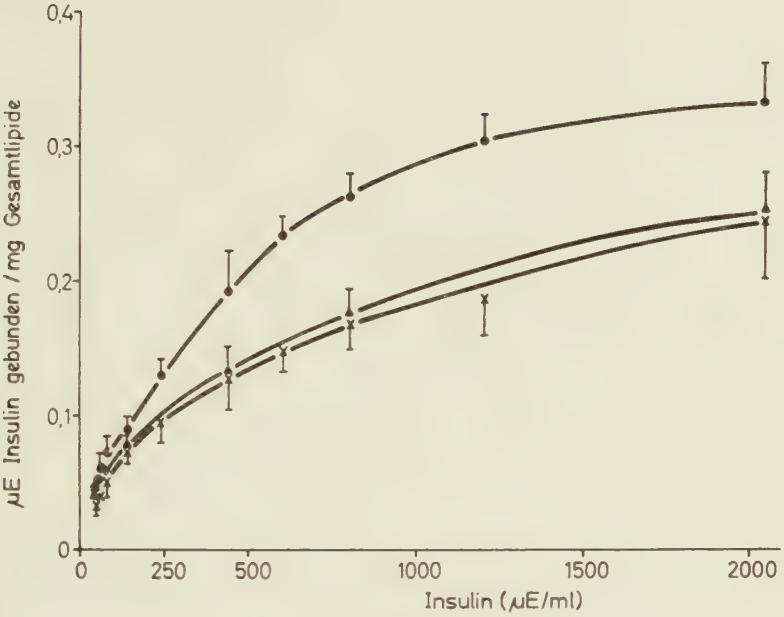

Abb. 1 : Insulinbindungswerte von Fettzellen der adrenalektomierten Gruppe (o), der scheinoperierten Gruppe (x) und der scheinoperierten und im Futter beschränkten Gruppe (Δ). Auf der Ordinate sind die Werte des insgesamt gebundenen Insulins aufgetragen (radioaktiv markiertes und unmarkiertes Insulin), auf der Abszisse die Gesamtmenge Insulin im Inkubationsmedium. Die Werte bei der adrenalektomierten und der scheinoperierten Gruppe ergeben sich als Mittelwert aus 8 Versuchen ± SEM, bei der scheinoperierten und im Futter beschränkten Gruppe aus 5 Versuchen ± SEM. Der Unterschied zwischen den Bindungswerten der adrenalektomierten und der scheinoperierten Tieren ist bei allen im Test verwendeten Insulinkonzentrationen statistisch signifikant ($p \leq 0,01$).

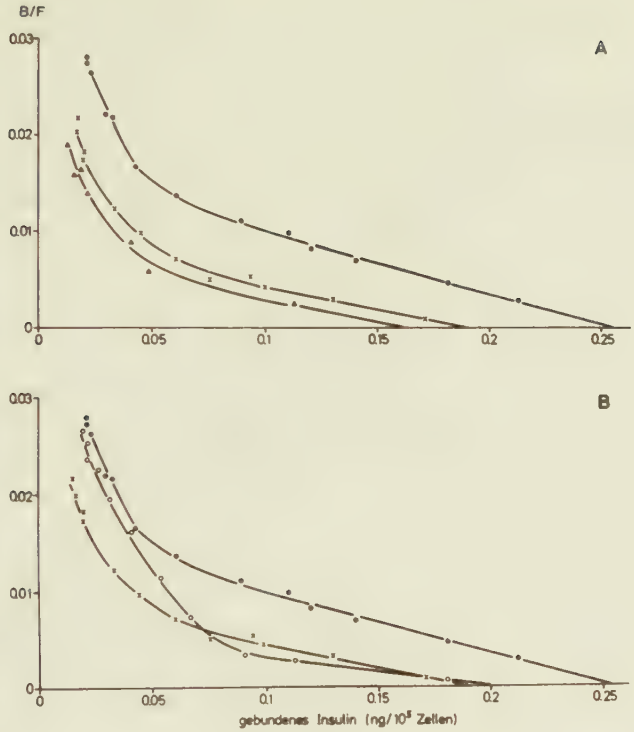

Abb. 2 a : Analyse der Insulinbindungswerte von Fettzellen von scheinoperierten (x), adrenalektomierten (●) und adrenalektomierten, Cortison substituierten Ratten (△) in Form des Scatchard-Plot.

Abb. 2 b : Scatchard-Analyse der Insulinbindung von Fettzellen der adrenalektomierten und mit Insulin substituierten Ratten (o), zum Vergleich die Kurven der scheinoperierten (x) und der adrenalektomierten Ratten (●). Die Werte stellen den Mittelwert aus 8 Versuchen ± SEM dar.

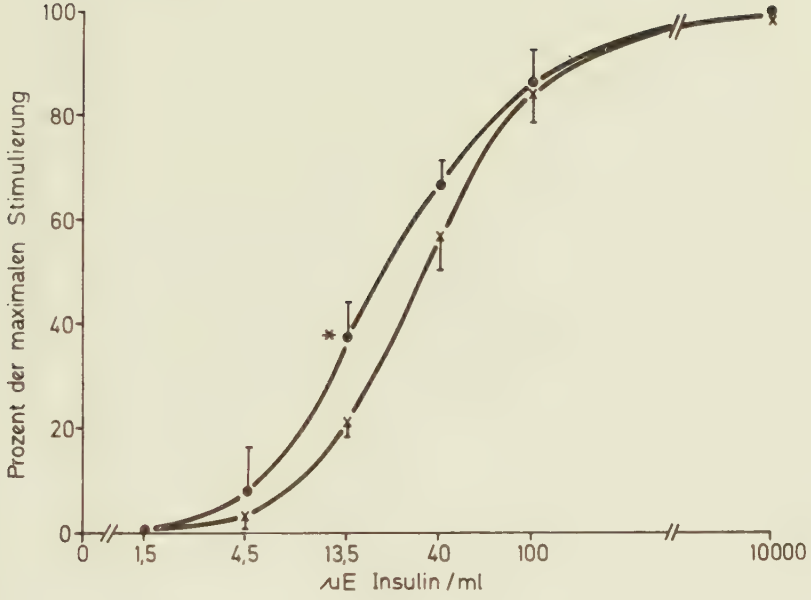

Abb. 3 : Dosis-Wirkungskurve des Insulineffekts auf den 3-O-Methylglucose-Transport in die Fettzellen von adrenalektomierten (o) und scheinoperierten Ratten (x). Die aufgetragenen Punkte stellen den Mittelwert aus 7 Versuchen ± SEM dar. Die Daten sind als Prozentsatz maximaler Stimulation berechnet. Der Unterschied der Werte bei den Insulinkonzentrationen 13,5 µU/ml (durch Stern gekennzeichnet) ist statistisch signifikant bei $p \leq 0{,}025$.

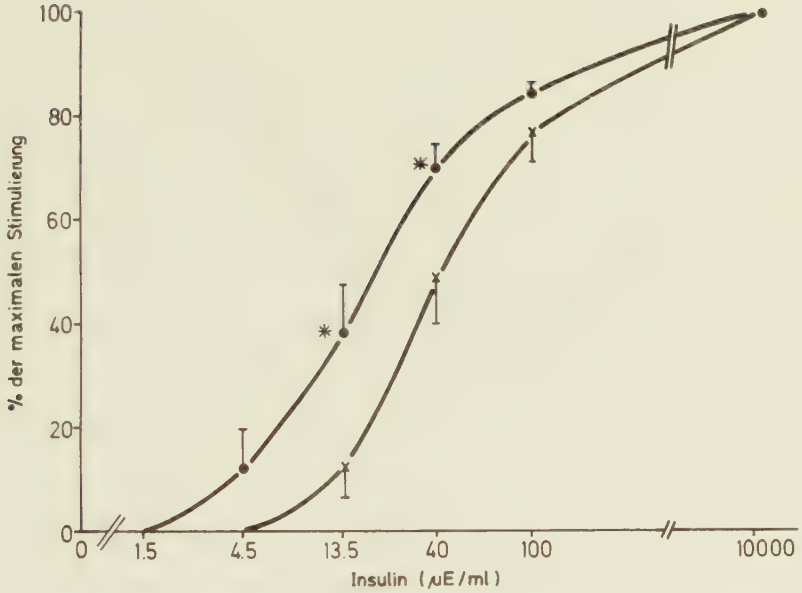

Abb. 4 : Einbau von 2-(^{3}H)-Glucose in die Gesamtlipide der Fettzellen von adrenalektomierten (o) und scheinoperierten Ratten (x). Es sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen ± SEM aufgetragen. Die Daten sind als Prozentsatz maximaler Stimulation berechnet. Der Unterschied der Werte bei den Insulinkonzentrationen 13,5 und 40 µU/ml (durch Stern gekennzeichnet) sind statistisch signifikant ($p \leq 0{,}02$).

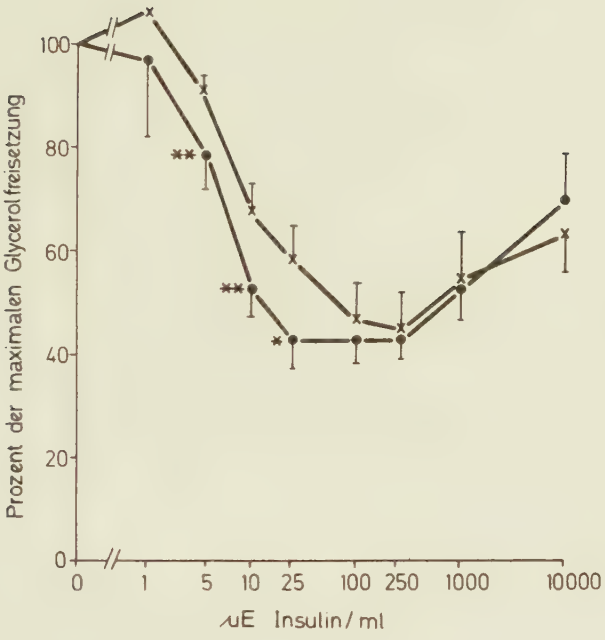

Abb. 5 : Antilipolytische Wirkung des Insulins auf die Fettzellen von adrenalektomierten (o) und scheinoperierten Ratten (x). Es sind die Mittelwerte aus 9 Versuchen ± SEM aufgetragen und stellen den Prozentsatz der Hemmung der Glycerolfreisetzung dar, die durch 10^{-6}M Isoproterenol bewirkt wird. Die Unterschiede der Werte bei den Insulinkonzentrationen 5, 10 und 25 µU/ml sind statistisch signifikant ($^{x}p \leq 0,05$, $^{xx}p \leq 0,025$).

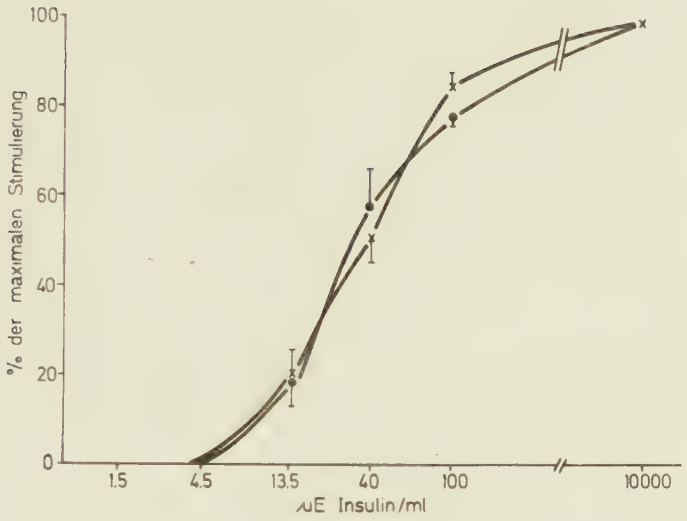

Abb. 6 : Wirkung des Insulins auf die $^{14}(CO_2)$-Produktion aus 1-(^{14}C)-Glucose an Fettzellen von adrenalektomierten (o) und scheinoperierten Ratten (x). Es sind die Mittelwerte aus 6 Versuchen $\pm$ SEM aufgetragen und stellen den Prozentsatz maximaler Stimulation dar.

3.4. Cortisonwirkung in vitro

Ein Ergebnis dieser Arbeit, die Erhöhung der Insulinbindung durch vergrößerte Kapazität der Rezeptoren nach Adrenalektomie und Normalisierung dieses Effekts durch Cortisonsubstitution, wirft die Frage auf, ob Cortison auch per se etwas an der Insulinbindung der Fettzellen verändern kann. Um die direkte Wirkung des Cortisons zu untersuchen, wurden isolierte Fettzellen von normalen Ratten mit Cortison und in einer Kontrollgruppe ohne Hormon vorinkubiert.

Nach 4 Stunden Vorinkubation mit einer Cortisonkonzentration, die beim Menschen nach Verabreichung von Cortison zu therapeutischen Zwecken erreicht wird, konnte kein Unterschied zwischen normalen und mit Cortison vorinkubierten Zellen in der Fähigkeit Insulin zu binden festgestellt werden. Dies bestätigt das Ergebnis der in vitro-Versuche mit 2,5 Stunden Vorinkubation von Olefsky 1975 (45).

4. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen an isolierten Fettzellen von adrenalektomierten Ratten eine höhere Insulinbindung im Vergleich zu Zellen von scheinoperierten Tieren. In der Analyse nach Scatchard (Abb. 2 a) wird deutlich, daß nicht die Affinität der Rezeptoren für Insulin verändert wird, sondern die Kapazität vergrößert ist. Die bisherigen Untersuchungen über die Auswirkung der Adrenalektomie auf die Insulinbindung sind widersprüchlich : Olefsky et. al beschreiben, daß bei der Gabe von Dexamethason in vivo die Insulinbindung an den Fettzellen zwar abnimmt, jedoch im umgekehrten Fall nach Adrenalektomie keine Veränderung der Bindung festzustellen ist (44). Demgegenüber finden Goldfine et al.(19) bei Lebermembranen von Ratten im Zustand nach Implantation eines ACTH, STH und Prolaktin produzierenden Hypophysentumors eine verminderte Insulinbindung, die sich durch Adrenalektomie wieder normalisieren läßt. Dies Ergebnis gibt einen indirekten Hinweis auf einen Einfluß der Adrenalektomie bezüglich der Insulinbindung. 1978 beschreiben Kahn et al. einen Anstieg der Insulinbindung an Lebermembranen von adrenalektomierten Tieren, die sie anhand der Scatchard-Analyse auf eine gesteigerte Affinität der Rezeptoren für Insulin zurückführen (27). In der hier vorliegenden Untersuchung konnte keine Änderung der Affinität der Rezeptoren für Insulin festgestellt werden; jedoch ist nicht auszuschließen, daß sie im Bereich geringerer Insulinkonzentrationen auch beobachtet werden könnte. Solche niedrigen Konzentrationen unter 4ng/ml wurden in unseren Untersuchungen nicht eingesetzt.

Die Adrenalektomie geht mit einem erniedrigten Insulinspiegel einher. Malaisse et al . versuchten dies so zu erklären, daß nach Adrenalektomie der Insulingehalt des Pankreas zwar nicht reduziert ist, daß jedoch nach Provokation mit Glucose weniger Insulin ausgeschüttet wird. Auf Grund dieser Ergebnisse vermuteten die Autoren, daß

die Glucocorticoide einen direkten Einfluß auf die Sensitivität der Beta-Zelle für Glucose ausüben könnten (37).

Die erniedrigten Insulinspiegel kann man eventuell als Ursache für die erhöhte Insulinbindung an den Fettzellen der adrenalektomierten Ratten ansehen. In den letzten Jahren wurde der Einfluß des Insulins auf seinen Rezeptor in verschiedenen in vivo und in vitro Modellen untersucht und auch beim Menschen studiert. In verschiedenen in vitro Systemen haben die Versuche überzeugend gezeigt, daß Insulin seinen Rezeptor direkt regulieren kann. So fand sich an menschlichen Lymphozyten, die über Stunden mit Insulin inkubiert worden waren, ein Abfall der Insulinrezeptorkonzentration (17). Dieses Ergebnis ließ sich auch in vivo reproduzieren, am Modell der ob/ob Maus, die genetisch determiniert Hyperglykämie, Hyperinsulinämie und eine Resistenz gegenüber exogenem Insulin aufweist. Eine Untersuchung der Insulinbindung an Lebermembranen, Muskel- und Fettzellen dieser Tiere ergab eine erniedrigte Rezeptorenkonzentration im Vergleich zu Normaltieren, aber keine Veränderung in der Affinität der Rezeptoren für Insulin, der biologischen Spezifität, Temperaturabhängigkeit, Assoziations- und Dissoziationskinetiken und der negativen Kooperativität (15,55,56). Das inverse Verhältnis von Insulinrezeptorkonzentration und Insulinspiegel ließ sich auch im Fall des erniedrigten Insulinspiegels nachweisen, und zwar durch die Behandlung von ob/ob Mäusen mit Streptozotozin, die die Hyperinsulinämie beseitigte und eine Erhöhung der Rezeptorkonzentration zur Folge hatte (16). Auch an einem anderen Modell, dem diabetischen Chinesischen Hamster, der sehr niedrige Insulinspiegel aufweist, läßt sich eine erhöhte Konzentration von Insulinrezeptoren an Leberzellmembranen zeigen (21). Bei Untersuchungen an Ratten im Fastenzustand mit Insulinmangel fanden Olefsky et al. als Ursache für die erhöhte Insulinbindung eine gesteigerte Affinität der Rezeptoren (48).

Die Ergebnisse der Rezeptorregulation durch Insulin aus in vitro Studien und Tierversuchen lassen sich auch auf den Menschen übertragen. Bei übergewichtigen insulinresistenten Menschen mit Hyperinsulinämie wurden am Fettgewebe (38) und an zirkulierenden Monozyten (1) erniedrigte Insulinrezeptorkonzentrationen festgestellt. In Versuchen, in denen übergewichtige insulinresistente Patienten mehrere Wochen auf Diät gesetzt wurden, konnte ein Abfall der Seruminsulinspiegel und ein Anstieg der Insulinbindung an Monozyten und Fettzellen als Folge einer höheren Rezeptorkonzentration registriert werden (4). Bei Patienten mit Insulinom (5) und Akromegalie (41), die ebenfalls einen hohen Insulinspiegel aufweisen, ließ sich eine erniedrigte Insulinbindung feststellen, die auf einer Niederregulation der Rezeptoren beruhte. Zusätzlich fand sich in diesen Fällen auch eine Veränderung der Affinität der Rezeptoren.

Die Adrenalektomie nun stellt ein Modell des Insulinmangels dar, bei dem nach dem Gesetz der inversen Regulation von Insulinspiegeln und Insulinrezeptoren eine Hoch-Regulation der Rezeptoren zu verzeichnen ist. Allerdings ist zu fragen, ob der Insulinspiegel allein für die Rezeptormodulation verantwortlich ist, wie später diskutiert werden soll.

Es ist beobachtet worden, daß adrenalektomierte Tiere in geringerem Ausmaß an Gewicht zunehmen als Normaltiere (13,54). Diese Tatsache machte eine Kontrollgruppe scheinoperierter Tiere notwendig, die mit begrenzter Futtermenge die relative Inappetenz der adrenalektomierten Ratten nachahmen sollten. Das Ergebnis des Insulinbindungstests mit den Zellen der scheinoperierten und kontrolliert gefütterten Tiere schließt einen Einfluß der relativen Inappetenz auf die Erhöhung der Rezeptorbindung bei den adrenalektomierten Tieren aus (siehe Abb. 1).

Die Substitution der adrenalektomierten Ratten mit Cortison erhöhte den Insulinspiegel auf fast das Doppelte des Wertes der scheinoperierten Tiere. Dieser hohe Insulinspiegel ist möglicherweise für den fehlenden Anstieg der Rezeptorenzahl verantwortlich (siehe Abb. 2 a). Deutlich erkennbar folgt nach Insulinsubstitution der adrenalektomierten Tiere die Bindungskurve bei der Analyse nach Scatchard im Bereich niedriger Insulinkonzentrationen den Zellen adrenalektomierter Tiere, im Bereich hoher Insulinkonzentrationen den Zellen der Kontrollgruppe. Dieser Kurvenverlauf ist auf Grund der verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten der Scatchard-Analyse schwierig zu interpretieren.

Das Problem, ob es einen einheitlichen Insulinrezeptor gibt, dessen Bindungsverhalten sich verändern kann, oder ob es zwei verschiedene Rezeptorenklassen gibt, wird seit langem diskutiert. Der kurvlineare Scatchard Plot, der sich bei der Analyse der Insulinbindung ergibt, läßt beide Deutungen zu. Verschiedene Autoren deuten den Kurvenverlauf der Scatchard-Analyse als einen Ausdruck der "negativen Kooperativität", was bedeutet, daß die Affinität des Rezeptors um so mehr abnimmt je mehr Rezeptoren besetzt werden (11). Ein vom Insulin besetzter Rezeptor beeinflußt die freien Rezeptoren seiner Umgebung nach dieser Theorie im Sinne einer Affinitätsverminderung. Für dieses Verhalten haben Jacobs und Cuatrecasas andererseits (22) die "Hypothese des mobilen Rezeptors" aufgestellt, die besagt, daß der Rezeptor, der in der Zellmembran frei beweglich ist, sich reversibel mit dem Effektor verbindet um dessen Aktivität zu bestimmen, wobei die Affinität des Hormon-Rezeptor-Komplexes für den Effektor größer ist als die Affinität des nicht vom Hormon besetzten Rezeptors.
Auf der anderen Seite postulieren Kahn et al. zwei verschiedene Rezeptorenklassen: Eine "high affinity-low capacity-class " mit $K = 2 \times 10^{9}\ M^{-1}$, und eine "low affinity-high capacity-class" mit $K = 2,1 \times 10^{8}\ M^{-1}$, (25). Eine Unterstützung dieser Hypothese, daß es zwei Rezeptorenklassen gibt, leisteten Livingston und Krupp

(30), indem sie durch Gelelektrophorese aus den Insulin-bindenden Proteinen zwei Anteile mit unterschiedlicher Michaelis-Menten-Konstante isolierten.
Die Veränderung des Bindungsverhaltens der Zellen der insulinsubstituierten adrenalektomierten Tiere gegenüber den Zellen der scheinoperierten Tiere in unserer Untersuchung ist am besten mit der Hypothese zweier Rezeptorenklassen zu vereinbaren.

Die Veränderung der Insulinbindung bei Cortisonmangel trotz hoher Insulinspiegel im Sinne einer Hoch-Regulation der Affinität deuten darauf hin, daß das Cortison einen direkten Einfluß auf die Insulinbindung hat. Dieser Befund wird auch unterstützt durch die Versuche von Cigolini et al. (10), die bei menschlichen Fettzellen nach in vitro Vorinkubation mit Cortison einen direkten Einfluß des Hormons auf die Insulinbindung im Sinne einer Nieder-Regulation der Rezeptoren zeigen.
Die Möglichkeit eines Einflusses von anderen Hormonen, wie TSH, ACTH oder STH auf die Insulinbindung zeigen die Versuche von Schoenle et al. (53) an hypophysektomierten Ratten. Die Autoren fanden an deren Fettzellen eine Insulinbindung, die nur 63 % der Bindung von Normaltieren erreichte.
Unsere Aussagen stehen im Widerspruch zu Interpretationen derjenigen Autoren, die den Einfluß von Cortisonmangel oder Cortisonüberschuß auf die Insulinbindung stets als indirekten Effekt über die veränderten Insulinspiegel betrachten. So kann Olefsky bei der in vitro Vorinkubation von 2,5 Stunden mit Dexamethason keine Veränderung der Insulinbindung an den Fettzellen feststellen und schließt daraus, daß beim in vivo Modell dieser Effekt nicht direkt durch das Glucocorticoid, sondern über den erhöhten Insulinspiegel vermittelt wird (44).

Wie wirkt sich nun die erhöhte Rezeptorenzahl bei den Zellen der adrenalektomierten Tiere auf die Insulinwirkung aus ?

Bei den Fettzellen dieser Ratten zeigte sich eine Erhöhung der Sensitivität für Insulin bei submaximalen Insulinkonzentrationen in verschiedenen Testsystemen, während die maximale Stimulierbarkeit bei den adrenalektomierten Tieren und der Kontrollgruppe gleich war, wie Abb. 3,4 und 5 verdeutlichen. Diese Beobachtung ist mit Hilfe der Theorie der "spare receptors" zu deuten. Kono et al. (29) beschreiben, daß der maximale Insulineffekt an Fettzellen bereits erreicht wird, wenn nur ein Bruchteil der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen für Insulin (~10 %) besetzt ist. Die restlichen Rezeptoren der Zelle (~90 %) werden als "spare receptors" bezeichnet, die jedoch funktionell genauso in der Lage sind, das Signal, das durch die Insulinbindung vom Rezeptor ausgeht, zu übertragen. Erhöht sich nun die Gesamtzahl der Rezeptoren, so werden nach dem Massenwirkungsgesetz bei submaximalen Insulinkonzentrationen mehr Rezeptoren besetzt, d.h. die Dosis-Wirkungskurve wird nach links verschoben gegenüber der Kurve der Kontrollgruppe mit weniger Rezeptoren. Der maximale Effekt wird früher erreicht, ist jedoch quantitativ derselbe. Diesem Modell entsprechend fanden wir eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve nach links bei der Insulinwirkung auf Glucose-Transport, Lipogenese und Lipolyse. Der maximale Insulineffekt war dabei unbeeinflußt.

In den Untersuchungen der Antilipolyse bei adrenalektomierten Tieren zeigte sich, wie bereits bei Fernandez et al. (13) beschrieben, eine geringere Ansprechbarkeit dieser Zellen auf die Katecholamine, aber eine erhöhte Empfindlichkeit für den antilipolytischen Effekt des Insulins.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Smith et al. (54), die überhaupt keinen antilipolytischen Effekt des In-

sulins in maximaler Dosierung bei den Fettzellen adrenalektomierter Ratten sehen.
In Bezug auf die Lipogenese nach Stimulation mit Insulin erhalten Jeanrenaud et al. (23) niedrigere Raten bei den Zellen der adrenalektomierten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es ist nicht gelungen, eine Erklärung für die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Untersuchung mit den genannten Arbeiten zu finden.

Die erhöhte Insulinbindung wird nicht von einer Erhöhung der Raten aller hier untersuchten Stoffwechselwege begleitet. Nachdem der Glucosetransport bei den Zellen der adrenalektomierten Tiere gesteigert ist und die Lipogeneseraten, vielleicht auch auf Grund des höheren Substratangebotes, in der Zelle ebenfalls gesteigert sind, wäre zu erwarten, daß es sich mit der Glucoseoxidation ebenso verhält. Dies ist jedoch nicht der Fall, wie Abb. 6 zeigt. Die Ursache hierfür muß wohl hinter dem Rezeptor gesucht werden. Es wurde mehrfach beschrieben, daß eine Änderung in der Insulinbindung nicht immer von gleichsinnigen Änderungen des Zellmetabolismus gefolgt ist (53,59). So finden Olefsky et al. bei den Fettzellen von Ratten, die hungerten, zwar einen Anstieg der Insulinbindung, aber einen Abfall der Insulinsensitivität für den Glucosetransport und die Glucoseoxidation (47). Ein anderes Beispiel findet sich in der Arbeit von Goldfine et al. (20), in welcher eine Zunahme des Aminosäureeinstroms in Thymozyten von hypophysektomierten und säugenden Jungen Ratten nach Stimulation mit Insulin im Verhältnis zu ausgewachsenen normalen Ratten festgestellt wird. Eine entsprechende Erhöhung der Insulinbindung läßt sich jedoch nur bei den Zellen der hypophysektomierten Tiere erkennen, die Thymozyten der säugenden Ratten binden genauso viel Insulin wie die der Kontrollgruppe.
Es geht aus der vorliegenden und den genannten Untersuchungen hervor, daß die Insulinsensitivität der Erfolgsorgane des Hormons zwar durch den Rezeptorbesatz beeinflußt werden kann, jedoch nicht unbedingt beeinflußt wer-

den muß. Es gibt sicherlich Faktoren hinter dem Rezeptor, wahrscheinlich in den Enzymsystemen der Zelle, die neben dem Rezeptor die Wirkung des Insulins entscheidend bestimmen. Diese Faktoren sind bisher unbekannt.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung könnten eine neue Interpretation einer seit langem bekannten klinischen Beobachtung zulassen. Die erhöhte Empfindlichkeit der Fettzellen von adrenalektomierten Tieren für Insulin entspricht dem klinischen Bild einer Nebenniereninsuffizienz beim Menschen, die unter anderem durch Hypoglykämien und einer Überempfindlichkeit gegenüber exogenem Insulin gekennzeichnet ist. Die Ursachen für die Veränderungen des Kohlenhydratstoffwechsels und der Insulinwirksamkeit in Zuständen des Cortisonüberschusses und des Cortisonmangels konnten bisher nicht befriedigend geklärt werden. Bei Patienten mit Steroiddiabetes fanden Oberdisse et al. (43) eine relative Unempfindlichkeit gegenüber exogen zugeführtem Insulin und räumten dem Cortison einen maßgeblichen Einfluß ein. In späteren Arbeiten wurde postuliert, daß die Störung der Glucosetoleranz im Cortisonüberschuss neben der gesteigerten Cortisonproduktion mit entsprechender Gluconeogenese auch auf einer Verminderung der Insulinwirkung auf die periphere Glucoseutilisation beruhe (3,42).
Für den Zustand des Cortisonmangels liegen ebenfalls Untersuchungen vor. So wurde schon 1908 das Auftreten von Hypoglykämien bei adrenalektomierten Hunden von Blerry et al. (7) beschrieben. Bei Patienten mit Nebennierenrindeninsuffizienz wurden erhöhte Insulinempfindlichkeit (14) und Neigung zu Hypoglykämien (39) festgestellt. 1969 untersuchten Bottermann et al. (9) Patienten mit unbehandeltem Morbus Addison und stellten fest, daß diese bei niedrigem Kohlenhydratanteil in der Nahrung schnell in hypoglykämische Zustände gerieten; es fanden sich bei ihnen dabei niedrige bis normale Nüchterninsulinspiegel.

Möglicherweise kann die von uns nachgewiesene erhöhte Insulinbindung und Insulinempfindlichkeit der Zellen nach Adrenalektomie die Symptome bezüglich des Kohlenhydratstoffwechsels der an Morbus Addison erkrankten Patienten, nämlich Neigung zu Hypoglykämien und Überempfindlichkeit gegenüber exogenem Insulin, erklären.

5. Zusammenfassung :

In dieser Arbeit wurden die Insulinbindung und der Insulineffekt auf den 3-O-Methylglucose-Transport, die Lipogenese aus Glucose, die Glucose-Oxidation und die Lipolyse an den Fettzellen von adrenalektomierten Ratten und einer Kontrollgruppe von scheinoperierten Ratten untersucht.

Die adrenalektomierten Tiere zeigten erniedrigte Serum-Insulinspiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Sensitivität der Fettzellen der adrenalektomierten Tiere gegenüber submaximalen Insulinkonzentrationen war in Bezug auf den 3-O-Methylglucose-Transport, die Lipogenese und die Lipolyse im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Im Fall der Glucose-Oxidation konnte kein signifikanter Unterschied der Insulinwirkung bei submaximaler Konzentration zwischen den beiden Gruppen festgestellt werden. Die maximal zu erreichende Insulinwirkung war in allen Testsystemen gleich.

Die erhöhte Sensitivität der Zellen der adrenalektomierten Tiere in den verschiedenen Testsystemen kann als Folge der um 37 % erhöhten Bindungskapazität der Rezeptoren dieser Fettzellen im Verhältnis zu denen der Kontrollgruppe angesehen werden. Das Fehlen eines Einflusses der Rezeptorregulation auf die Glucose-Oxidationsraten läßt auf Kontrollmechanismen hinter dem Rezeptor schließen. Adrenalektomierte Ratten, die mit Cortison oder mit Insulin substituiert worden waren, wiesen über den Normalwert erhöhte Seruminsulinspiegel auf. Die Veränderung der Rezeptorbindung nach Adrenalektomie wurde nur bei der Gruppe der Cortison-substituierten Tiere total verhindert; bei der Gruppe der Insulin-substituierten Tiere zeigte sich im Bereich niedriger Insulinkonzentrationen im Medium noch eine Erhöhung der Insulinbindung. Dieses Ergebnis läßt den Schluß zu, daß der Insulinrezeptor nicht nur vom Seruminsulinspiegel reguliert, sondern auch durch Cortison direkt beeinflußt werden kann.

Diese Untersuchungen könnten eine neue Interpretation der klinischen Beobachtung liefern, daß ein Cortisonmangel (Morbus Addison) mit Neigung zu Spontanhypoglykämien und einer Überempfindlichkeit gegenüber exogenem Insulin einhergeht.

Literatur :

(1) Archer, J.A., Gordon, P. Gevin, J.R., Lesniak, M.A., Roth, Y : Insulin receptors in human circulating lymphocytes : application to the study of insulin resistance in man. J. Clin. Endocrinology. Metab. 36, 627 - 633 (1973)

(2) Archer, J.A., Gordon, P., Roth, J. : Defect in insulin bindung to receptors in obese man : amelioration with caloric restriction. J. Clin. Invest. 55, 166 (1975)

(3) Ashmore, J., Morgan, D. : Metabolic effects of adrenal glucocorticoid hormones. In : The adrenal cortex (ed. Eisenstein, A.B.) Boston : Little, Brown & Co. (1967)

(4) Bar. R.S., Gorden, P., Roth, J., et al : Fluctuations in the affinity and concentration of insulin receptors on circulating monocytes of obese patients : effects of starvation, refeeding and dieting. J. Clin. Invest. 58, 1123 (1976)

(5) Bar, R.S., Gorden, P., Roth, J., et al : Insulin receptors in patients with insulinomas. J. Clin. Endocrinol. Metab. 44, 1210 (1977)

(6) Bergmeyer, H.U., Bernt, E.; Glucosebestimmung mit Glucoseoxydase und Peroxydase. In : Methoden der enzymatischen Analyse. H.U. Bergmeyer, editor, Verlag Chemie Weinheim, 3. Auflage, II, 1172 - 1179 (1974)

(7) Bierry, H., Malliozel, L.: Hypoglycaemie après décapsulation. Effects de l'injection d'adrenaline sur les animaux décapsulés.C.R. Soc. Biol. (Paris) 65, 232 (1908)

(8) Blackard, W.G., Guzelion, P.S., Small, M.E. : Down regulation of insulin receptors in primary cultures of adult rat hepatocytes in monolayer. Endocrinology 103, 548 - 553, (1978)

(9) Bottermann, P. : Früherkennung des Diabetes mellitus. Med. Klin. 64, 49 (1969)

(10) Cigolini, M., Bosello, O., Scuro, L.A., Smith, U. : Interrelations between glucocorticoid hormones and insulin : The influence of cortisol on insulin binding to human fat cells in vitro. Diabetologia 14, 224. (Abstr.) (1978)

(11) De Meyts, P., A.R. Bianco, and J. Roth : Site-site interactions among insulin receptors : Characterization of the negative cooperativity. J. Biol. Chem. 251, 1877 - 1888, (1976)

(12) Eggstein, M., Kuhlmann, E. : Triglyzeride und Glycerin. In : Methoden der enzymatischen Analyse. H.U. Bergmeyer, editor, Verlag Chemie Weinheim, 3. Auflage, II, 1871 - 1878 (1974)

(13) Fernandez, B.M., Saggerson, E.D.: Alternations in response of white adipocytes to insulin, noradrenaline, corticotropin and glucagon after adrenalectomy. Biochem. J. 174, 111 - 118 (1978)

(14) Fraser, R., Albright, F., Smith, P.H. : The value of the glucose tolerance test and the insulin tolerance test in the diagnosis of endocrinological disorders of glucose metabolism. J. Clin. Endocrin. 1, 297 - 303, (1941)

(15) Freychet, P., Laudat, M.H., Rosselin, G., Kahn, C.R., Gorden, P., Roth, J. : Impairment of insulin bindung to the fat cell plasma membrane in the obese hyperglycemic mouse. FEBS. Lett. 25, 339 - 342, (1972)

(16) Freychet, P. : Interactions of polypeptide hormones with cell membrane specific receptors : studies with insulin and glucagon. Diabetologia 12, 83, (1976)

(17) Gavin, J.R., III., Roth, J., Neville, D.M., Jr., De Meyts, P., Buell, D.N., : Insulin-dependent regulation of insulin receptor concentration: A direct demonstration in cell culture. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 84 - 88 (1974)

(18) Gliemann, J., Osterlind, K., Vinten, K., Gammeltoft, S. : A procedure for measurement of distribution spaces in isolated fat cells. Biochim. Biophys. Acta 286, 1 - 9 (1972)

(19) Goldfine, I.D., Kahn, C.R., Neville, M., Roth, J., Garrison, M.M., Bates, R.H. : Decreased binding of insulin to its receptors in rats with hormone induced insulin resistance. Biochem. Biophys. Res. Commun. 53, 852 - 587, (1973)

(20) Goldfine, I.D. : Binding of insulin to thymocytes from suckling and hypophysectomized rats. Evidence for two mechanisms regulating insulin sensitivity. Endocrinology 97, 948 - 954 (1975)

(21) Hepp, K.D., J. Langley, H.J.V. Funcke, R.Renner, W. Kemmler : Increased insulin binding capacity of liver membranes from diabetic Chinese Hamsters. Nature 258, 154 (1975)

(22) Jacobs, S., Cuatrecasas, P.: The mobile receptor hypothesis and cooperativity of hormone binding. Application to insulin Biochim. Biophys. Acta 433, 482 - 495 (1976)

(23) Jeanrenaud, B., Renold, A.E. : Studies on rat adipose tissue in vitro - VII. Effects of adrenal cortical hormones. J. Biol. Chem. 235, 2217 - 2223, (1960)

(24) Kahn, C.R., Neville, D.M., Jr., Gorden, P., Freychet, P., Roth, J. : Insulin receptor defect in insulin resistance. Studies in the obese hyperglycemic mouse. Biochim. Biophys. Res. Commun. 48, 135 - 142, (1972)

(25) Kahn, C.R., Freychet, P., Roth, J., Neville, D.M. : Quantitative aspects of the insulin receptor interaction in liver plasma membranes. J. Biol. Chem. 249, 2249 - 2257 (1974)

(26) Kahn, C.R., Roth, J. : Insulin receptors in disease states. In : Hormone-receptor interaction: molecular aspects. G.S. Levey, editor. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 1 - 29 (1976)

(27) Kahn, C.R., Goldfine, I.D., Neville, M.D., De Meyts, P. : Alternations in insulin binding induced by changes in vivo in the levels of glucocorticoids and growth hormone. Endocrinology 103, 1054 - 1066 (1978)

(28) Kono, T. : Destruction of insulin effector system of adipose tissue cells by proteolytic enzymes. J. Biol. Chem. 244, 1772 - 1778 (1969)

(29) Kono, T., Barham, F.W. : The relationship between the insulin binding capacity of fat cells and the cellular response to insulin. J. Biol. Chem. 246, 6210 - 6216 (1971)

(30) Krupp, M.N., Livingston, J.N. : Insulin binding to solubilized material from fat cell membranes : Evidence for two binding species. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2593 - 2597, (1978)

(31) Leathem, J.H. : Some aspects of hormone and protein metabolic interrelationship. In : Mammalian Protein Metabolism, H.N. Munro and J.B. Allison, editors, Academic Press, New York, Vol. I, 351 - 365. (1964)

(32) Le Marchand, Y., Loten, E.G., Assimacopoulos-Heannet, F., Forgue M.E., Freychet. P., Jeanrenaud, B. : Effect of fasting and streptozotocin in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse, apparent lack of direct relationship between insulin binding and insulin effects. Diabetes 26, 582 - 590, (1977)

(33) Levine, R., Goldstein, M.S., Huddleston, B., Klein, S.P. : Action of insulin on permeability of cells to free hexoses as studied by its effect on distribution of galactose. Am. J. Physiol. 163, 70 (1950)

(34) Löffler, G., Weiss, L. : Radioimmunologische Bestimmung von Insulin im Serum. In : Methoden der Hormonbestimmung. H. Breuer, D. Hamel, H.L. Krüskemper, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1975, S. 75 - 88

(35) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. Randall, R.J. : Protein measurement with the folin reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 - 275, (1951)

(36) Livingston, J.N., Purvis, B.J., Lockwood, D.H. : Insulin induced changes in insulin binding and insulin sensitivity of adipocytes. Metabolism 27, 2009 - 2014 (1978)

(37) Malaisse, W.J., Malaisse-Lagae, F., Mc. Graw, E.F., Wright, P.H. : Insulin secretion in vitro by pancreatic tissue from normal, adrenalectomized and cortisol treated rats. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 124, 924 - 928, (1967)

(38) Marinetti, G.V., Schlatz, L., Reilly, K. : Insulin Action (I.B. Fritz, editors) Academic Press, New York, 1972, pp. 207 - 276

(39) Maronon, G., Noguera, J.F. : La enfermedad de Addison (estudio de 400 casos) Madrid : Espasa-Calpe 1949

(40) Moody, A.J., Stan, M.A., Stan, M., Gliemann, J. : A simple free fat cell assay for insulin. Horm. Metab. Res. 6, 12 - 16 (1974)

(41) Muggeo, M., Bar, R.S., Roth, J., Kahn, C.R. : Two abnormalities in insulin binding to its receptor in the insulin resistence of acromegaly. Clin. Res. 26, 310 A (1978)

(42) Munck, A. : Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues : Old and new evidence molecular mechanism and physiological significance. Perspect. Biol. Med. 14, 265, (1971)

(43) Oberdisse, K. : Die Therapie mit Glucocorticoiden (Substitution, Hemmwirkung, Therapie mit pharmakologischen Dosen) Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmakol. exp. Path. 241, 102 (1961)

(44) Olefsky, J.M., Johnson, J., Lin, F., Jen, P., Reaven, G.M. : The effects of acute and chronic dexamethasone administration on insulin binding to isolated rat hepatocytes and adipocytes. Metabolism 24, 517 - 527, (1975)

(45) Olefsky, J.M. : Effect of dexamethasone on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation of isolated rat adipocytes. J. Clin. Invest. 56, 1499 - 1508, (1975)

(46) Olefsky J.M. : Decreased insulin binding to adipocytes and circulating monocytes from obese subjects. J. Clin. Invest. 57, 1165 - 1172, (1976)

(47) Olefsky, J.M. : Effects of fasting on insulin binding, glucose transport and glucose oxidation in isolated rat adipocytes, relationship between insulin receptors and insulin action. J. Clin. Invest. 58, 1450 - 1460, (1976)

(48) Olefsky, J.M., Kobayashi, M. : Mechanism of the fasting-induced increase in insulin binding to rat adipocytes. J. Clin. Invest. 61, 329 - 338, (1978)

(49) Pastan, I., Roth, J., Macchia, V. : Binding of hormone to tissue : The first step in polypeptide hormone action. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56, 1802 - 1809, (1966)

(50) Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., Newsholme, E.A., Denton, R.M., Pogson, C.J. : Interaction of metabolism and the physiological role of insulin. Rec. Progress Horm. Res. 22, 1 - 48, (1966)

(51) Renner, R., Von Funcke, H.J., Hepp, K.D. : The number of insulin receptors as a function of insulin levels in blood. Diabetologia 12, 416 (Abstr.) (1976)

(52) Rodbell, M. : Metabolism of isolated fat cells. I. Effects of hormones on glucose metabolism and lipolysis. J. Biol. Chem. 239, 375 - 380, (1964)

(53) Schoenle, E., Zapf, J., Froesch, E.R. : Reception binding and effects of insulin and NSILA-S on glucose transport and metabolism in adipocytes from hypophysectomized rats. Diabetologia 16, 41 - 46 (1979)

(54) Smith, S.J., Saggerson, E.D. : Decreased sensitivity to insulin in white adipose tissue from adrenalectomized rats. Horm. Metab. Res. 9, 474 - 480 (1977)

(55) Soll, A.H., Goldfine, I.D., Roth, J. et al. : Thymic lymphocytes in obese (ob/ob) mice : a mirror of the insulin receptor defect in liver and fat. J. Biol. Chem. 249, 4127 (1974)

(56) Soll, A.M., Kahn, C.R., Neville, D.M. : Insulin binding to liver plasma membranes in the obese hyperglycemic (ob/ob) mouse, demonstration of a decreased number of functionally normal receptors. J. Biol. Chem. 250, 4702 - 4707, (1975)

(57) Vinten, J., Gliemann, J., Osterlind, K. : Exchange of 3-0-methyl-glucose in isolated fat cells. J. Biol. Chem. 251, 794 - 800, (1976)

(58) Weitzel, G., Renner, R., Guiglielmi, H. : Insulin-ähnliche Aktivität von Arginylverbindungen in vitro. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1617 - 1630, (1971)

(59) Wieringa, T., Krans, H.M.J. : Reduced glucose transport and increased binding of insulin adipocytes from diabetic and fasted rats. Biochim. Biophys. Acta 538, 563 - 570, (1978)

(60) Zöllner, N., Kirsch, K. : Über die quantitative Bestimmung von Lipoiden (Mikromethode) mittels der vielen natürlichen Lipidoiden (allen bekannten Plasmalipoiden) gemeinsamen Sulphovanillin-Reaktion. Z. ges. exp. Med. 135, 545 - 551, (1962)

Lebenslauf:

4.1.1956 Geburt als Kind der Eheleute Renate und Erwin Bug in Fulda
Die ersten fünf Jahre meines Lebens verbrachte ich mit meinen Eltern in Frankfurt am Main.

1962 Versetzung meines Vaters nach München und im September Einschulung in die Volksschule an der Stuntzstraße.

1966 Übertritt an das neusprachliche Gymnasium Max-Josef-Stift an der Mühlbaurstraße.

1972 Für die Dauer der letzten beiden Schuljahre Wechsel an das St.-Anna-Gymnasium an der Annastraße.

1974 Abitur im Mai.

Im November Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ludwigs-Maximilians-Universität München.

1976 Ärztliche Vorprüfung am 27.August.

1977 Im Herbst Beginn des experimentellen Teils meiner Doktorarbeit bei der Forschergruppe Diabetes, III. Medizinische Klinik, Krankenhaus München Schwabing. Das Thema der Arbeit lautete: "Der Zusammenhang von Insulinbindung und Insulinwirkung bei Fettzellen adrenalektomierter Ratten."

1978 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 31.März.

1980 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 14.März.

1981 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 9.April.

Seit Beginn meines Studiums ist mein ständiger Wohnsitz:
Waisenhausstraße 78, 8000 München 19